

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-291857

(43)公開日 平成7年(1995)11月7日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

A 6 1 K 31/19

A 2 3 G 3/00

A 2 3 L 1/30

2/52

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

A B J

9455-4C

1 0 1

Z

A 2 3 L 2/00

F

審査請求 未請求 請求項の数2 書面 (全6頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平6-124755

(22)出願日

平成6年(1994)4月27日

(71)出願人 000001904

サントリー株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

(72)発明者 木曾 良信

大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号

サントリー株式会社生物医学研究所内

(72)発明者 児玉 亨

大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号

サントリー株式会社生物医学研究所内

(72)発明者 宮川 克郎

大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号

サントリー株式会社生物医学研究所内

最終頁に続く

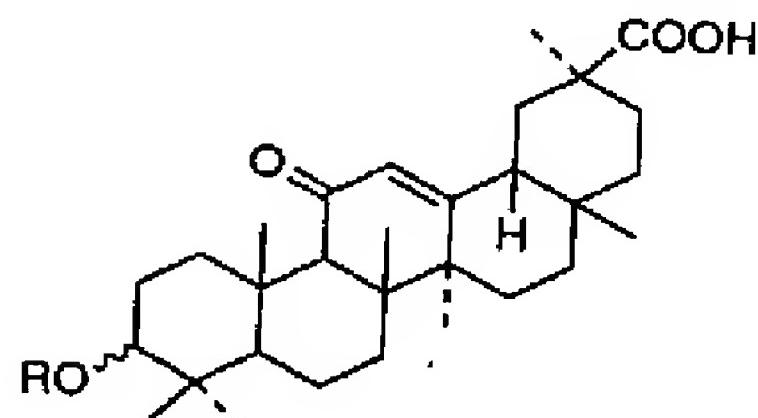
(54)【発明の名称】 グリチルレチン酸化合物を有効成分とする骨疾患の予防及び治療剤

(57)【要約】

ある。

【構成】 次の式(1)

【化1】



(式中、Rは水素原子またはグリコシル基を示す。)で表されるグリチルレチン酸化合物または3-デヒドログリチルレチン酸もしくはそれらの生理学的に許容される塩を有効成分とする骨疾患の予防・治療剤。

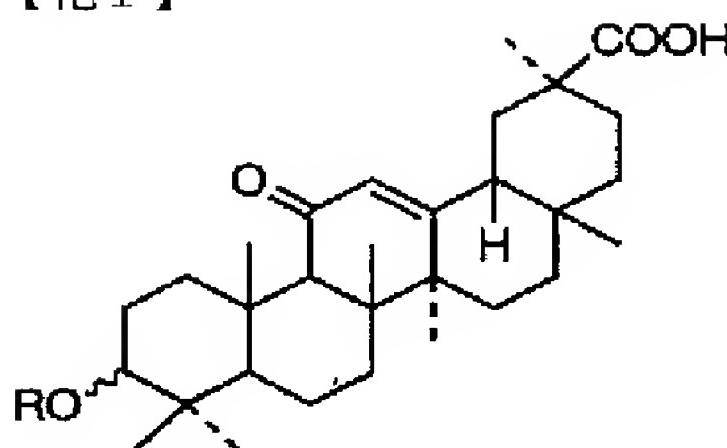
【効果】 本発明の有効成分は、PTHrp(1-34)により惹起された培養新生仔マウス頭蓋冠からのカルシウムおよび無機リン遊離を抑制することから、骨吸収作用を抑制することが確認され、吸収性骨疾患の予防または治療剤として有用である。また、本発明の有効成分を飲食物に添加して日常的に摂取することにより、吸収性骨疾患の予防のための保健用飲食物としても有用で

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】次の式(1)

【化1】



(式中、Rは水素原子またはグリコシル基を示す。)で表されるグリチルレチン酸化合物または3-デヒドログリチルレチン酸もしくはそれらの生理学的に許容される塩を有効成分とする骨疾患の予防・治療剤。

【請求項2】骨疾患が、悪性高カルシウム血症、骨ページェット病または骨粗鬆症である請求項1に記載の予防・治療剤。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、悪性高カルシウム血症、骨ページェット病または骨粗鬆症等の骨吸収性骨疾患の予防及び治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、高齢者人口の急激な増加と共に所謂老人病が増加している。中でも、骨粗鬆症をはじめとする骨疾患は、骨折を多発し、寝たきり老人に繋がる疾病として、その予防と治療法の開発が望まれている。

【0003】骨は一旦形成された後は全く変化しない構築物ではなく、骨形成と骨吸収のバランスの上にその構造および量は維持されている。従って、加齢あるいはその他の原因によりそのバランスが崩れると、種々の骨疾患を発症する。

【0004】骨吸収の異常亢進によって起きる疾患としては、骨髄腫やリンパ腫などが原因で起こる悪性高カルシウム血症、局所性骨吸収よりもたらされる骨ページェット病、原因は不明であるが加齢により骨量が減少する骨粗鬆症等が挙げられる。

【0005】骨は主に有機質であるコラーゲン線維と無機質であるカルシウム塩からなり、この両者が結びついで、張力にも圧力にも強い強固な構築物である骨が形成される。とりわけ、カルシウム塩は全骨重量の70%を占めるが、骨粗鬆症のような骨吸収性の骨疾患においては、その進行と共にカルシウム塩が骨から血液中に溶出して高カルシウム血症を伴い、骨からカルシウム塩が徐々に失われて行く。

【0006】これまで、このような疾患の予防にはカルシウムを維持する方法が、また治療にはカルシウムを補う方法が採用され、活性型ビタミンD<sub>3</sub>製剤およびカルシウム製剤等が用いられてきた。また、骨からの脱灰を抑制する目的でエストロゲン製剤およびカルシトニン製

10 2

剤のようなホルモン剤が用いられてきた。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】しかし、これらの薬剤の効果は、疼痛の軽減、病状の進行の防止等にはある程度の効果が認められるものの、その効果は満足のいくものではなく、より確実な効果を示す薬効成分が求められている。さらに、吸収性骨疾患の予防の目的で当該成分を日常的に摂取する場合は、経口摂取が望ましく、とりわけ飲食物の配合成分として、飲食物と共に摂取し得る安全性の高いものであることが望まれている。

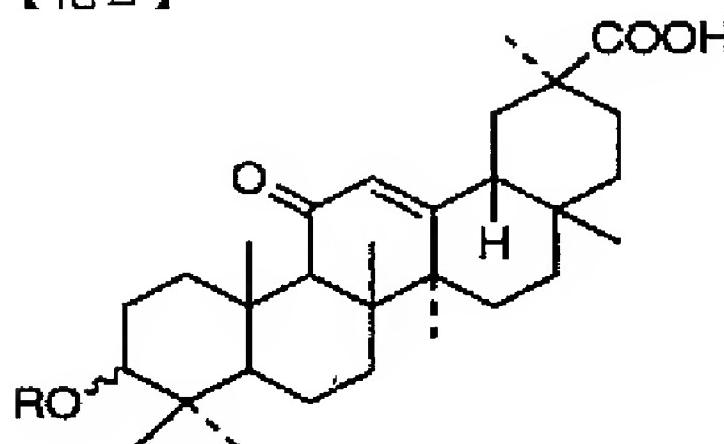
【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者等は先に、PTHrP(副甲状腺ホルモン関連蛋白質)またはその活性フラグメントが誘発する培養新生仔マウス頭蓋冠からのカルシウムおよび無機リン酸遊離が、骨粗鬆症のような吸収性骨疾患のメカニズムと高い相関関係を有することを知った。そしてこの手法を用いて、吸収性骨疾患に対する予防および治療効果を種々の化合物について探索していたところ、ヘデラゲニン化合物がこの評価系で、カルシウムおよび無機リン酸の遊離抑制作用を示すことを見出し、特許出願を行った(特願平5-178441)。さらに本発明者らは、サポニン化合物について、この手法を用いて鋭意スクリーニングを行ったところ、種々のグリチルレチン酸化合物がこの評価系で、カルシウムおよび無機リン酸の遊離抑制作用を示すことを見出し本発明を完成した。

【0009】すなわち、本発明は、式(1)

【0010】

【化2】



30

【0011】(式中、Rは水素原子またはグリコシル基を示す。)で表されるグリチルレチン酸化合物およびその3位がカルボニル基に変換された3-デヒドログリチルレチン酸またはそれらの生理学的に許容される塩を有効成分とする骨疾患の予防・治療剤を提供するものである。

40

【0012】本発明に用いられるグリチルレチン酸化合物とは、グリチルレチン酸〔式(1)においてRが水素原子であり、3位の立体配置がSである化合物〕、3-エピーグリチルレチン酸〔式(1)においてRが水素原子であり、3位の立体配置がRである化合物〕および式(1)においてRの水素原子が種々のグリコシル基で置換したグリチルレチン酸配糖体を意味し、例えばマメ科スペインカンゾウ(Glycyrrhiza glab

50

r a) のサポニン成分であるグリチルリチン等の配糖体を例示することができる。

【0013】また、後記実施例に示すように、アグリコンであるグリチルレチン酸自体が骨吸収抑制作用を示すため、グリチルリチンの部分加水分解物および、種々の糖転移酵素反応等によってRに種々のグリコシル基を導入した種々のグリチルレチン酸配糖体等も本発明に有効に用いることができる。

【0014】本発明に用いられるグリチルレチン酸化合物は、日本薬局方「カンゾウ」の有効分として知られる公知化合物であり、去痰剤、解毒剤、肝臓疾患用剤、抗アレルギー剤および消炎剤等の用途が知られているが、これらの化合物が、骨吸収抑制作用を示し、骨粗鬆症等の吸収性骨疾患に有効であるとの知見は得られていないかった。

【0015】本発明に用いられるグリチルレチン酸化合物は、例えば上記のマメ科スペインカンゾウ等の植物体から精製された天然物でも、公知の方法により合成された合成品であっても良い。さらに、アグリコンであるグリチルレチン酸に種々の糖転移酵素反応等によってRに種々のグリコシル基を導入した半合成品であっても良い。また、天然物を用いる場合は、必ずしも純品にまで精製する必要はなく、本発明の効果を損なわない範囲で、抽出物、粗精製物、種々のグリチルレチン酸化合物の混合物等を用いることができる。例えば、第十二改正日本薬局方に「カンゾウ」、「カンゾウ末」、「カンゾウエキス」および「カンゾウ粗エキス」として記載されているので、市販品をそのまま使用することができる。

【0016】本発明の有効成分は、古来より広く用いられている薬用植物の成分であり、通常量の経口投与では毒性に何ら問題は認められない。例えば、本発明の有効成分の一種であるグリチルリチンのマウス腹腔内投与におけるLD<sub>50</sub>は805mg/kg（日本医薬品集324頁 1991年 薬業時報社）、そのアグリコンであるグリチルレチン酸のマウス腹腔内投与におけるLD<sub>50</sub>は約308mg/kg（同 325頁）と記載されている。また、一般にサポニン化合物には溶血性を示し、この溶血性はグリコシル基の除去によって消失することが知られている（生物活性天然物質 419頁 医歯学出版 1978年）が、本発明の有効成分の一種であるグリチルリチンは溶血性が弱い（シーガル等、バイオケミカルファーマコロジー 15卷 1411頁 1966年）ため、経血管投与の場合にも、配糖体のままで用いることができる。

【0017】本発明の吸収性骨疾患の予防・治療剤は、上記のグリチルレチン酸化合物を有効成分とし、常法に従って公知の医薬品用担体と組合させて製剤化することにより製造される。また、これらの化合物を配合して製剤を製造する場合には、所望に応じて、これらの化合物のナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩等の生理

学的に許容される塩の型で配合することも可能である。

【0018】本発明の有効成分は常法に従って種々の剤型での投与が可能である。例えば経口投与剤としては、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、細粒剤、シロップ剤、ドライシロップ剤等が例示でき、非経口投与剤としては、注射剤の他、坐薬、膣坐薬等の坐剤、噴霧剤等の経鼻投与剤、軟膏、経皮吸収性テープ等の経皮吸収剤が例示できる。

【0019】また、本発明の有効成分を通常の飲食物中に添加して、日常的に摂取することも可能である。添加し得る食品の種類には特に限定はないが、本発明の有効成分には特有の風味があるため、例えばドリンク剤等の飲料や、キャンディー等の甘味の強い食品に、食品本来の味を損なわない範囲である0.01～1重量%程度を添加することが好ましい。

【0020】本発明の有効成分を経口投与する場合には、有効成分の合計として、通常成人1日当たり1～1000mg/kg、好ましくは3～30mg/kgを1～3回に分けて投与すれば良い。また、本発明の有効成分を飲食物等に添加して日常的に摂取する場合の摂取量も、経口投与の場合の投与量に準ずる。これらは、年齢、症状等により適宜増減することが可能である。

【0021】また、本発明の有効成分を非経口的に投与する場合には、有効成分の血中濃度を勘案して、経口投与の場合の約10分の1程度の投与量とすれば良く、有効成分の合計として、通常成人1日当たり0.1～10mg/kg、好ましくは0.3～3.0mg/kgを1～3回に分けて投与すれば良い。これらの投与量は、年齢、症状等により適宜増減することが可能である。

【0022】次に、本発明の有効成分であるグリチルレチン酸化合物について、そのカルシウムおよび無機リン酸の遊離抑制作用の評価方法について説明する。

【0023】PTHrpは、ヒトの高カルシウム血症惹起因子として同定された蛋白質であり、この1-34番目のアミノ酸残基よりなるフラグメントであるPTHrp(1-34)は活性型である。そして、このPTHrp(1-34)は、イン・ビトロで骨吸収促進作用が示されている（ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション、81卷、2号、596-600頁、1988年；エンドクリノロジー、123卷、2841-2848頁、1988年）、骨粗鬆症の評価系として使用することが可能である。

【0024】そこで、本発明有効成分のイン・ビトロでの骨吸収抑制作用の評価を、培養新生仔マウス頭蓋冠およびPTHrp(1-34)を用いて行った。この評価系は、胎児ラットの前腕骨および<sup>45</sup>Caを使用するロイズの方法（ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション、44卷、1号、103-116頁、1965年）に改良を加えたもので、放射性同位元素を使用せずに、多数の検体を安全に評価できる利点を有す

る。

【0025】この改良法は、すでに骨疾患治療剤にスクリーニング系として広く用いられている方法（日本骨代謝学会雑誌、8巻、3号、221頁、1990年；同9巻、3号、239頁、1991年；ジャパニーズ・ジャーナル・オブ・ファーマコロジー、55巻、補遺1号、120頁、1991年）であるが、その概略を説明すれば以下の通りである。

【0026】即ち、4～6日齢ICR系マウスの頭蓋冠を採取し、1日間前培養したのち、検定すべき試料および $10^{-8}$ MのPTHrp(1-34)を添加した培地に交換してさらに2日間培養し、培養終了後、培養上清中のカルシウムおよび無機リン濃度を測定し、PTHrp(1-34)のみの添加群と比較する方法である。

【0027】この方法で、骨吸収抑制作用を評価したところ、後記実施例に示す様に、本発明の化合物を添加した群は、PTHrp(1-34)のみの処理群に較べて培養上清中のカルシウムおよび無機リン濃度が低下していることが判明した。

【0028】

【作用】本発明の有効成分であるグリチルレチン酸化合物は、後記実施例に示す様に、副甲状腺ホルモン関連ペプチドであるPTHrp(1-34)が惹起する培養新生仔マウス頭蓋冠からのカルシウムおよび無機リン酸遊離を抑制する作用を有する。このように本発明で有効成分として使用されるグリチルレチン酸化合物は、カルシウムおよび無機リン酸遊離を抑制する作用を有するので、悪性高カルシウム血症、骨ページェット病、骨粗鬆

症等の吸収性骨疾患有効に予防・治療するものと推測される。

【0029】

【実施例】ついで、実施例に基づいて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0030】実施例1．PTHrp(1-34)により惹起された培養新生仔マウス頭蓋冠からのカルシウムおよび無機リン遊離に対する抑制効果の測定

ICR系マウス(4～6日齢)の頭蓋冠を切り出して軟組織を除去した後、直径4mmにパンチアウトする。これを、5%FBS-BGJb培地〔5%ウシ胎児血清を含むBGJb培地(Fittton-Jackson modification/Sigma社製)〕を含む48穴プレートに1片ずつ入れて、37℃、5%炭酸ガス／空気の条件下に24時間前培養する。前培養終了後、 $10^{-8}$ MのPTHrp(1-34)および表に示す濃度の試料を含む5%FBS-BGJb培地に交換し、さらに48時間培養する。

【0031】培養終了後、日本電子(株)製のVX1000型生化学自動分析装置を用いて、培養上清のカルシウム濃度をOCP法で、無機リン濃度をモリブデン酸直接法で測定し、PTHrp(1-34)のみ添加の対照群の値と比較して、骨吸収作用を検討した。この結果を〔表1〕に示す。

【0032】

【表1】

7  
グリチルレチン酸化合物の新生仔マウス頭蓋冠における骨吸収抑制作用

化合物	添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	PTHrp 処理	Ca 濃度( $\text{mg}/\text{dl}$ )		無機P濃度( $\text{mg}/\text{dl}$ )	
			平均値 (%)	平均値 (%)	平均値 (%)	平均値 (%)
コントロール	—	あり	12.10 (100)	4.52 (100)		
	—	なし	9.93 (82)	3.46 (77)		
グリチルレチン酸	10	あり	11.72 (97)	4.27 (95)		
	30	あり	10.79 (89)	3.82 (85)		
	100	あり	9.64 (80)	3.35 (74)		
3-デヒドログリチルレチン酸	10	あり	10.73 (87)	3.75 (83)		
	30	あり	10.36 (86)	3.63 (80)		
	100	あり	9.31 (77)	3.18 (70)		
3-エピグリチルレチン酸	10	あり	12.08 (100)	4.57 (101)		
	30	あり	11.13 (92)	4.16 (92)		
	100	あり	8.97 (74)	3.15 (70)		
グリチルリチン	10	あり	11.53 (95)	4.17 (93)		
	30	あり	11.50 (95)	4.11 (91)		
	100	あり	11.23 (93)	4.03 (89)		

N = 2 の平均値

【0033】〔表1〕の結果から明らかなように、本発明のグリチルレチン酸化合物はいずれもカルシウムおよび無機リン酸の遊離を抑制した。この結果から、本発明のグリチルレチン酸化合物が悪性高カルシウム血症を予防または抑制し得るものであることが強く示唆され、本発明の化合物が骨疾患の予防・治療剤として有用であることが明らかとなった。

#### 【0034】実施例2. カプセル剤の製造

##### 〔処方〕

グリチルリチン	100部 (重量部)
馬鈴薯澱粉	148部 リ
ステアリン酸マグネシウム	2部 リ

【0035】〔製法〕処方に従って上記成分を擂潰機でよく混和した後、1号ハードゼラチンカプセルに250 mgづつ充填し、1カプセル中100 mgのグリチルリチンを含有するカプセル剤を得た。

#### 【0036】実施例3. 直腸坐剤の製造

ウイテップゾールH-15を加温融解し、これにグリチルレチン酸を濃度12.5 mg/m1になるように加えて均一に混和し、次いでこれを直腸坐剤用金型に2 ml ずつ注入し、冷却して1剤中25 mgのグリチルレチン酸を含有する直腸坐剤を製造した。

#### 【0037】実施例4. ドリンク剤の製造

##### 〔処方〕

*グリチルリチン	4 g
D L-酒石酸ナトリウム	10 mg
コハク酸	1 mg
30 液糖	80 g
クエン酸	1.2 g
ビタミンC	1 g
香料	1 ml
塩化カリウム	0.1 g
硫酸マグネシウム	50 mg

【0038】〔製法〕処方に従って上記の成分を蒸留水800 mlに溶解し、蒸留水を加えて全量1000 mlとした後、0.22 μmの除菌フィルターで滅菌し、100 mlずつ褐色びんに無菌充填して、1剤あたり400 mgのグリチルリチンを含有するドリンク剤を得た。

#### 【0039】実施例5. キャンディーの製造

##### 〔処方〕

日本薬局方カンゾウ末	2 g
精製水	1 g
グラニュー糖	49 g
水飴	48 g
クエン酸	0.5 g
レモン香料	0.5 g

【0040】〔製法〕常法に従ってグラニュー糖および水飴を加熱熔融し、その他の成分を精製水に懸濁して加

えた後、均一に混和して1粒2gのキャンディーを製造した。1粒に40mgのカンゾウ末を含有する。

## 【0041】

【発明の効果】本発明の有効成分であるグリチルレチン酸化合物は、PTHrp(1-34)により惹起された培養新生仔マウス頭蓋冠からのカルシウムおよび無機リン遊離を抑制することから、骨吸収作用を抑制することが確認された。そして、これらの有効成分は、古来より

広く用いられている薬用植物の成分であり、安全性において特に問題になる点はないものである。

【0042】従って、本発明の吸収性骨疾患の予防・治療剤は、悪性高カルシウム血症、骨ページェット病、骨粗症等の吸収性骨疾患の予防または治療に有用なものである。また、本発明の有効成分を飲食物に添加して日常的に摂取することにより、吸収性骨疾患の予防のための保健用食品等としても有用である。(以上)

## 【手続補正書】

【提出日】平成7年3月17日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

## 【補正内容】

## 【0032】

【表1】

## グリチルレチン酸化合物の新生仔マウス頭蓋冠における骨吸収抑制作用

化合物	添加濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	PTHrp 処理	Ca濃度(mg/dl) 平均値 (%)	IP*濃度(mg/dl) 平均値 (%)
コントロール	-	あり なし	12.10 9.93 (100) (82)	4.52 3.46 (100) (77)
グリチルレチン酸	10 30 100	あり	11.72 10.79 9.64 (97) (89) (80)	4.27 3.82 3.35 (95) (85) (74)
3-デヒドログリチルレチン酸	10 30 100	あり	10.73 10.36 9.31 (87) (86) (77)	3.75 3.63 3.18 (83) (80) (70)
3-エピグリチルレチン酸	10 30 100	あり	12.08 11.13 8.97 (100) (92) (74)	4.57 4.16 3.15 (101) (92) (70)
グリチルリチン	10 30 100	あり	11.53 11.50 11.23 (95) (95) (93)	4.17 4.11 4.03 (93) (91) (89)

N = 2 の平均値, IP \* : 無機リン

## フロントページの続き

(51)Int.C1.<sup>6</sup>

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

A 6 1 K 31/70

C 0 7 C 62/32

9450-4H

C 0 7 H 15/256

Z

C 0 7 J 63/00

9051-4C

(72)発明者 中原 光一

大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号

サントリー株式会社生物医学研究所内